

B3

### UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Mali	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

LEVADURA METILOTRÓFICA MODIFICADA DE *P. PASTORIS* DE SECRECIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANO

## 5 CAMPO TECNICO DE LA INVENCION.

La presente invención se relaciona con el área biofarmacéutica, particularmente con la producción de la hormona del crecimiento humano (HGH por sus siglas en inglés) que se ha usado exitosamente en el tratamiento de diversos problemas de salud. Mas específicamente se relaciona con el uso de tecnología del ADN recombinante para la producción de hormonas recombinantes del crecimiento humano (HGHr) en levaduras metilotróficas transformadas con la secuencia del ADNc de HGH madura y la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*, y que bajo la regulación de una región promotora inducible con metanol de un gene de levadura metilotrófica y cultivada bajo ciertas condiciones, permiten la expresión y secreción de HGHr hacia el medio de cultivo. La invención también se relaciona con dichas levaduras metilotróficas, los fragmentos de DNA y los vectores usados en dicha transformación.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

Los problemas en los que actualmente se utiliza HGH como parte de la terapia son: tratamiento del enanismo hipofisiario (causado por mal funcionamiento de la hipófisis); remoción de ácidos grasos y por ende en el tratamiento de la obesidad; mejora de la vascularización; promoción de la ganancia de masa muscular en ancianos; en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas, y en la aceleración de la regeneración de tejidos dañados.

La hormona del crecimiento humano (HGH) o somatotropina es un polipéptido globular de 191 aminoácidos sin residuos de azúcares, con un peso molecular aproximado de 22kDa. Tomando en cuenta el modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino, se considera que la HGH está constituida por 4 hélices alfa antiparalelas. La molécula presenta dos enlaces disulfuro que conectan la hélice 4 con el extremo carboxilo terminal de la proteína y la hélice 1 con la 4 (Devos *et al.* 1992).

La producción de HGH en la hipófisis es episódica y está regida por la acción de dos hormonas hipotalámicas, el factor liberador de la hormona del crecimiento y la somatostatina. Mientras que el primero estimula su síntesis, la segunda inhibe su liberación. La hormona actúa directamente sobre las células del tejido blanco, o a través de intermediarios de tipo hormonal, llamados somatomedinas (Daughaday, 1985), los efectos catabólicos de la HGH incluyen: incremento de la lipólisis, oxidación de los ácidos grasos y transporte disminuido de glucosa, con la consecuente elevación de la concentración de glucosa en sangre (Daughaday, 1985). Los efectos anabólicos incluyen: incremento en el transporte de aminoácidos con

disminución de su catabolismo y estimulación de la síntesis de ADN, ARN y proteínas a nivel hepático (Campbell, 1988). En términos generales, se considera que el efecto neto de HGH y de las somatomedinas es anabólico (Welsh, 1985). Entre las funciones importantes de la HGH se encuentra su participación en el crecimiento post-natal.

La importancia de la HGH y su aplicación en el área biofarmacéutica se refleja en los usos que ha tenido, ha sido utilizada de forma exitosa en el tratamiento del enanismo hipofisiario, remueve ácidos grasos y por ello es empleada en el tratamiento de obesidad, mejora la vascularización y promueve la ganancia de masa muscular en ancianos; es usada en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas y acelera la regeneración de tejidos dañados (Watson, 1991).

La HGH recombinante fue sintetizada por primera vez en *Escherichia coli* (*E. coli*) (2.4 mg/L de medio cultivo) por Goeddel y colaboradores en 1979 bajo el control del promotor *lac* (Goeddel *et al*, 1979). La secreción al periplasma de la bacteria fue lograda por Gray y cols en 1985, cuya estrategia consistió en utilizar el ADNc de HGH en fusión con la región que codifica para el péptido señal del gen de la fosfatasa alcalina de *E. coli*, logrando producir 0.28 mg/L de la hormona, de los cuales el 82% se dirigió hacia el espacio periplásmico (Gray, *et al*, 1985). Becker y Hsiung en 1986 alcanzaron una concentración de 15 mg/L de HGH en el espacio periplásmico gracias al péptido señal de la proteína de la membrana externa (OMP) de *E. coli*, Chang y cols en 1987, al fusionar el ADNc de HGH a la región que codifica para el péptido señal de la enterotoxina II de *E. coli*, utilizando el promotor de la fosfatasa alcalina de esta misma bacteria, produjeron 15.4mg/L de HGH, de los cuales el 90% se exportó al periplasma. Kato y cols. en 1987 reportaron la síntesis de HGH y su secreción al medio de cultivo, mediante el uso de un plásmido híbrido kill-HGH. El gen kill expresa una proteína que permeabilizaba la membrana externa. La concentración de HGH que se alcanzó fue de 20.5 mg/L de los cuales 11.2mg/L se secretaron al medio y 8.6mg/L permanecieron en el periplasma. Hsiung y cols, en 1989 usaron la proteína liberadora de bacteriocina para permitir que la HGH recombinante, la cual había sido secretada al periplasma gracias a la presencia del péptido señal de OMP, fuera secretada al medio de cultivo con una concentración de hasta 69.6 mg/L. Además de en *E. coli*, la HGH recombinante ha sido producida también en *B. subtilis*, *S. cerevisiae* y células de mamíferos, sin embargo la síntesis de HGH recombinante en estas últimas ha resultado con rendimientos muy bajos (del orden de µg/L) (Ortiz-López, 1992; y Pavlakis *et al*, 1991).

Las levaduras pueden ofrecer ventajas sobre las bacterias en la producción de proteínas heterólogas, ya que a pesar de ser organismos unicelulares de fácil manipulación y crecimiento rápido, su organización celular es eucariótica, permitiendo la realización de

procesos de expresión y maduración característicos de células animales y vegetales. Además, pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo, siendo los niveles del producto recombinante más altos en este último que en el citoplasma. Aún más, los productos secretados son obtenidos con alto grado de pureza (pues pocas proteínas endógenas son secretadas) y por consiguiente las etapas de purificación se reducen. Finalmente, ofrecen un ambiente apto para el plegamiento adecuado de proteínas sobre todo de aquellas que contienen enlaces de disulfuro.

*Pichia pastoris* es una levadura capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono y energía (metilotrófica) y es empleada actualmente para la producción de proteínas recombinantes, debido a que como sistema de producción es mas sencillo, barato y rendidor que otros sistemas de eucariotes superiores. Al ser una levadura comparte las ventajas de fácil manipulación genética y bioquímica con *S. cerevisiae* pero supera a ésta en los niveles de producción de proteínas heterólogas (10 a 100 veces mayores) (Cregg *et al*, 1993; y Romanos, 1995). Además se han desarrollado sistemas de expresión en *P. pastoris* que superan los problemas asociados con *S. cerevisiae*, tales como aumentar el número de copias y la estabilidad del mismo al momento del escalamiento. Este sistema se caracteriza por el empleo de un promotor que conduce la expresión del gen heterólogo. Este promotor es derivado de un gen de la levadura inducible con metanol y sujeto a una regulación precisa, conduciendo con frecuencia a altos niveles de expresión del gen heterólogo.

*P. pastoris* ha sido usada en la producción de varias proteínas heterólogas, por ejemplo el antígeno de superficie de la hepatitis B (Cregg, *et al*, 1987), lisozima e invertasa (Digan, 1988; Tschopp, 1987), factor de necrosis tumoral (Sreekrishna, 1989), entre otras. Sin embargo esfuerzos para producir otros productos de genes heterólogos en *Pichia pastoris*, especialmente vía secreción, han dado resultados variables, así se tienen ejemplos de bajos rendimientos, han dado resultados variables, así se tienen ejemplos de bajos rendimientos, proteólisis de la proteína secretada, ineficiente secreción y en algunos casos no se ha detectado el producto protéico (Romanos, 1995). Con los estudios que se tienen hasta el momento al respecto, es difícil predecir si una proteína en particular será sintetizada y/o secretada en una levadura metilotrófica o si ésta tolerará la presencia de la proteína heteróloga producida; de la misma manera, también es difícil predecir si estos procesos serán eficientes.

Considerando 1) que los niveles de producción de una proteína recombinante en cultivo a nivel matraz no reflejan con precisión los niveles de producción observados a nivel fermentador; 2) que de acuerdo a la literatura referida a *P. pastoris*, estos niveles se elevan considerablemente cuando *P. pastoris* se cultiva a gran escala, 3) la disponibilidad de tecnología sobre fermentaciones a altas densidades celulares para *P. pastoris*, y 4) los altos

niveles de producción y eficiente secreción de HGH recombinante que caracteriza sorprendentemente al sistema e expresión descrito por primera vez en la presente invención, el desarrollo biotecnológico aquí aportado, ofrece importantes ventajas tecnológicas y económicas para la producción de HGH recombinante.

#### DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1. Representación esquemática del corte preparativo del vector pJT. Presentando la estructura de pJT con sus elementos mas importantes y los productos obtenidos después de la digestión con las enzimas *Xba I-Sma I*.

FIGURA 2. Representación esquemática del corte preparativo del vector de expresión pPIC9 de *Pichia pastoris*. Se representa la estructura de pPIC9 con sus elementos más importantes y los productos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas *Xho I* y *Sna BI*.

FIGURA 3. Estructura del plásmido de expresión pPIC9hGH22K. El plásmido pPIC9hGH22k (A) que contiene la secuencia que codifica para la HGH madura en los sitios *Xho I - Sna BI* entre el promotor AOX1 (5' AOX1) y el terminador AOX1-t). Las dos formas de integración cromosómica que se obtienen son; (B) integración del vector en HIS4, (C) integración del vector en AOX1.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de HGH puede ser producido por células de levadura metilotrófica que contiene en su genoma al menos una copia de la secuencia de ADNc que codifica para HGH asociada de forma funcional con la secuencia del ADN codificante para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* (incluyendo el sitio del procesamiento proteolítico: lys-arg) y bajo la regulación de una región promotora de un gene de una levadura metilotrófica inducible con metanol.

El producto polipeptídico producido de acuerdo con la presente invención es secretado en el medio de cultivo en alta concentración; además el sistema de expresión inventado condujo excelentes resultados debido al hecho de que la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* funciona adecuadamente para dirigir la secreción de HGH en levaduras metilotróficas. El término "secuencia de ADN codificante de HGH funcionalmente operable" usado en la presente descripción, incluye la siguiente secuencia de ADNc que codifica para el polipéptido de HGH:

Met ala thr gly ser arg thr ser leu leu leu ala phe gly leu leu cys leu pro trp

-25                      -20                      -15                      -10

leu gln glu gly ser ala phe pro thr ile pro leu ser arg leu phe asp asn ala met

-5                      1                      5                      10  
 leu arg ala his arg leu his gln leu ala phe asp thr tyr gln glu phe glu glu ala  
 15                      20                      25                      30  
 tyr ile pro lys glu gln lys tyr ser phe leu gln asn pro gln thr ser leu cys phe  
 5                      35                      40                      45                      50  
 ser glu ser ile pro thr pro ser asn arg glu glu thr gln gln lys ser asn leu glu  
 55                      60                      65                      70  
 leu leu arg ile ser leu leu leu ile gln ser cys ala gly ala val gln phe leu arg  
 75                      80                      85                      90  
 10                      ser val phe ala asn ser leu val tyr gly ala ser asp ser asn val tyr asp leu leu  
 95                      100                      105                      110  
 lys asp leu glu glu gly ile gln thr leu met gly arg leu glu asp gly ser pro arg  
 115                      120                      125                      130  
 thr gly gln ile phe lys gln thr tyr ser lys phe asp thr asn ser his asn asp asp  
 15                      135                      140                      145                      150  
 ala leu leu lys asn tyr gly leu leu tyr cys phe arg lys asp met asp lys vl glu  
 155                      160                      165                      170  
 thr phe leu arg ile val gln cys arg ser val glu gly ser cys gly phe AMB  
 175                      180                      185                      190

20                      Esta secuencia es conocida en el estado de la técnica y puede obtenerse por  
 retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc) de HGH y  
 convirtiendo éste último en doble cadena de ADNc. La secuencia de ADN de HGH requerida  
 puede también ser removida, por ejemplo, con enzimas de restricción de vectores conocidos  
 conteniendo la secuencia del gen ó el ADNc de HGH; ejemplo de tales vectores y las formas  
 25                      para su preparación pueden ser tomadas de varias publicaciones, entre ellas Goeddel (1979),  
 Gay *et al* (1985), Becker y Hsiung (1986), Chang *et al* (1987), Kato *et al* (1987), Hsiung *et al*  
 (1989), Ortiz-López (1992) y Pavlakis *et al* (1991).

La secuencia nucleotídica que codifica para la HGH madura de preferencia a usar de  
 acuerdo con la presente invención se presenta subrayada a continuación. Las letras negritas y  
 30                      mayúsculas se señalan el sitio *Xba* I, creado por mutagénesis, y las letras negritas y  
 minúsculas el sitio *Sma* I natural de la región 3' no traducible de ésta.

ATGGCTACAGGCTCCCGACGTCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGG                      60  
 CTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTATCTAGACTTTTGGACAACGCTATG                      120  
 35                      CTCCGCGCCCATCGTCTGCACCACTGGCCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCC                      180  
 TATATCCCAAGGAACAGAGTATTCATTCTCTGCAGAACCCCAAGACCTCCCTCTGTTTC                      240

TCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAG	300
CTGCTCCGCGATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCCTCAGG	360
AGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTA	420
AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGGAAGATGGCAGCCCCCGG	480
5 ACTGGGCAGATCTTCBAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGAC	540
GCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAG	600
ACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgecc	660
ggg	663

10 Las especies de levadura comprendidas para su uso en la presente invención son especies metilotróficas, las cuales son capaces de crecer en medios conteniendo metanol u otros sustratos como otras fuentes de carbono.

Dentro de las especies que poseen las rutas bioquímicas necesarias para el empleo del metanol se encuentra 4 géneros: *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*.

15 En la presente invención, la especie de levadura preferida para el uso en la práctica es *Pichia pastoris*, una cepa de levadura conocida a nivel industrial y que es capaz de utilizar el metanol de forma eficiente como única fuente de carbono y energía.

Existen varios genes inducibles por metanol en las levaduras metilotróficas, cuya expresión es controlada por una región reguladora (también referidas como promotores) inducible en metanol. Cualquiera de estos promotores inducibles con metanol son apropiados para el uso en la práctica de la presente invención. Ejemplo de estas regiones regulatorias específicas, incluyen los siguientes promotores de *P. pastoris*: promotor del gen del alcohol oxidasa I (AOX1), promotor del gen de alcohol oxidasa II (AOX2), promotor del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS), promotor para el gen P40, promotor del gen de la catalasa y  
25 semejantes.

La región promotora de preferencia a emplear para conducir la expresión del ADNc codificante para HGH es derivada del gen de la alcohol oxidasa inducible con metanol de *P. pastoris*. Esta levadura es conocida por tener dos genes funcionales de la alcohol oxidasa: alcohol oxidasa I (AOX1) y la alcohol oxidasa II (AOX2). Las regiones codificantes de los dos  
30 genes AOX son estrechamente homólogas, los sitios de restricción comunes son similares y la secuencia de aminoácidos es parecida. Las proteínas expresadas por los dos genes poseen propiedades enzimáticas similares, pero el promotor del gen AOX1 es mas eficiente en cuanto a su función reguladora y con niveles mas altos del producto de gen que regula el promotor del gen AOX2; por eso su uso es preferido para expresión de HGH. El gen AOX1, incluyendo su  
35 promotor ha sido aislado y caracterizado por Ekkus *et al* (1985), y reportado en la Patente Norteamericana U.S. 4,855,231.

El cassette de expresión usado para transformar las células de una levadura metilotrófica, contiene, además del promotor inducible con metanol del gen de una levadura metilotrófica y la secuencia del ADNc que codifica para HGH, la secuencia de ADN que codifica



para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*, incluyendo la secuencia de ADN que procesa el sitio: lys-arg (también referida como secuencia codificante lys-arg) y un terminador de la transcripción funcional en una levadura metilotrófica.

5 El factor alfa-mating de *S. cerevisiae* es un polipéptido de 13 residuos, secretado por células del tipo alfa del apareamiento (Thorner *et al*, 1981). La secuencia pre-pro del factor alfa es una secuencia líder contenida en la molécula precursora del factor alfa de apareamiento, incluye la secuencia codificante lys-arg, la cual es necesaria para el procesamiento proteolítico y secreción (Goeddel, 1991).

10 El terminador de la transcripción funcional en una levadura metilotrófica usada, de acuerdo con la presente invención, contiene tanto (a) un subsegmento, el cual codifica para la señal de poliadenilación y el sitio de poliadenilación en el transcrito y/o (b) un subsegmento, el cual provee una señal de terminación de la transcripción para la transcripción del promotor usado en el cassette de expresión. El término "cassette de expresión" usado aquí, y a través de las especificaciones y reivindicaciones, se refiere a la secuencia de ADN que incluye las  
15 secuencias funcionales tanto para el proceso de expresión y de secreción. El terminador de la transcripción completo es tomado de un gen que codifica una proteína, el cual puede ser el mismo o diferente al gen fuente del promotor.

Para la práctica de la presente invención es preferible que copias múltiples del antes descrito cassette estén contenidas en un fragmento de ADN de preferencia en una orientación  
20 cabeza-cola. Estos pueden construirse con procedimientos ya conocidos actualmente en el estado de la técnica (Cregg *et al*, 1993).

El fragmento de ADN de acuerdo a esta invención también comprende un gen marcador de selección. Para estos propósitos, cualquier gen marcador de selección funcional en una levadura metilotrófica puede ser empleado; cualquier gen que confiera un fenotipo  
25 distinto a una célula de levadura metilotrófica, y por lo tanto permitiendo a éstas ser identificadas y cultivadas de forma selectiva de la mayoría de las células no transformadas. Genes marcadores de selección apropiados incluyen, por ejemplo, sistemas marcadores de selección compuestos de un mutante auxotrófico de cepas de *P. pastoris* y un gen biosintético de tipo silvestre, el cual complementa el defecto en las células hospederas. Por ejemplo, para  
30 la transformación de cepas de *P. pastoris* His4-, pueden ser empleados el gen HIS4 de *S. cerevisiae* ó de *P. pastoris*, o para la transformación de mutantes de Arg4-, pueden ser empleados el gen ARG4 de *S. cerevisiae* y de *P. pastoris*.

Además, el fragmento de ADN de acuerdo con esta invención, puede contener genes marcadores de selección funcionales en bacterias. Así, puede ser empleado cualquier gen que  
35 confiera un fenotipo en bacterias que le permita transformarlas para su identificación y cultivo

selectivo o identificarlas de la gran mayoría de las células no transformadas. Este marcador de selección adicional permite que el ADN de la invención sea introducido en bacterias tales como *E. coli* para su amplificación. Genes marcadores de selección apropiados incluyen: el gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>), el gen de resistencia a tetraciclina (Tc<sup>r</sup>), y los semejantes.

5 Cuando es contemplado introducir el ADN de esta invención a través de células bacterianas, es deseable incluir en la construcción del ADN un origen de replicación bacteriano, para asegurar el mantenimiento de generación a generación en la bacteria del ADN de la invención. Ejemplos de orígenes de replicación bacteriano incluyen: F1, colisina, col E1, y semejantes.

10 Si la levadura hospedera es transformada con un fragmento de ADN lineal conteniendo el ADNc que codifica para HGH y la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* necesaria para su procesamiento y secreción y ambas bajo la regulación de un promotor de un gen de *P. pastoris* y el cassette de expresión es integrado en el genoma del hospedero por alguna de las técnicas de recombinación genética conocidas en el estado de la técnica, tales  
15 como reemplazamiento del gen por recombinación homóloga a través de un evento de entrecruzamiento simple o por inserción (Rothstein, 1983; y Cregg, 1987). El fragmento de ADN lineal es dirigido hacia el *locus* deseado, el gen objetivo es interrumpido en su marco de lectura, debido principalmente a que los extremos de la secuencia del ADN poseen suficiente homología con el gen objetivo para efectuar la integración del fragmento del ADN en éste. En  
20 la interrupción del marco de lectura del gen en una etapa es usualmente aplicable, si el ADN que es introducido tiene por lo menos 0.2kb de homología con el fragmento *locus* del gen objetivo; sin embargo, es preferible optimizar el grado de homología para lograr la eficiencia.

Si el fragmento de ADN de acuerdo a esta invención es contenido en un vector de expresión, por ejemplo un plásmido circular; una o más copias del plásmido pueden ser  
25 integradas en el mismo o diferentes *loci* por adición en el sitio interrumpido en el genoma. Linearización del plásmido con enzimas de restricción facilitan este tipo de integración.

El fragmento de ADN relacionado con la invención puede ser empleado para transformar células de levaduras metilotróficas como un fragmento linearizado cuyos extremos contienen secuencias de ADN que presentan homología suficiente con el gen objetivo para  
30 poder llevar a cabo la integración de dicho fragmento de ADN en el genoma de la levadura. En ese caso, la integración toma lugar por reemplazamiento en el sitio objetivo del gen. De forma alternativa, el fragmento de ADN puede formar parte de un plásmido circular el cual puede ser linearizado para facilitar la integración, y se integrará por adición al sitio homología en el genoma del hospedero y la secuencia del plásmido circular el cual puede ser linearizado para

facilitar la integración, y se integrará por adición al sitio de homología entre el genoma del hospedero y la secuencia del plásmido.

En el término vector de expresión empleado aquí, se entiende que se incluyen vectores capaces de expresar secuencias de ADN contenidas en ellos, de donde tales secuencias están asociadas funcionalmente con otras secuencias capaces de afectar su expresión, como por ejemplo, secuencias promotoras. En general, vectores de expresión habitualmente usados en las tecnologías de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de "plásmidos", ADN de doble cadena circular, el cual en su forma de vector no está unido al cromosoma. En la presente descripción al término "vector" y "plásmido" son usados de forma indistinta, sin embargo, en la presente invención se entiende que se pueden incluir otras formas de vectores de expresión las cuales sean funcionalmente equivalentes.

En el fragmento de ADN de la presente invención, los segmentos del cassette de expresión asociados funcionalmente, indican que la secuencia de ADN codificante para el polipéptido de HGH está colocada y orientada funcionalmente con respecto al promotor, a la secuencia de ADN codificante para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* (incluyendo las secuencias de ADN codificante para el sitio de procesamiento: lys-arg), y al terminador de la transcripción. Así, el segmento codificante del polipéptido es transcrito bajo la regulación de la región promotora, a un transcrito capaz de proveer, después de llevar a cabo la traducción, el polipéptido deseado. Debido a la presencia de la secuencia pre-pro del factor alfa, el producto expresado del ADNc de HGH es encontrado como producto secretado hacia el medio de cultivo. Un marco de lectura apropiado y la orientación de los segmentos del cassette de expresión están dentro del conocimiento de personas ordinariamente relacionadas con el estado de la técnica; detalles adicionales de construcción de dicho cassette están dados en los ejemplos.

El fragmento de ADN proporcionado por la presente invención pueden incluir secuencias que permiten su replicación y selección en bacterias; de esta forma, grandes cantidades del fragmento de ADN puede ser producidos por su replicación en la bacteria.

Métodos para la transformación de levaduras metilotróficas, tales como, *Pichia pastoris*, así como los métodos aplicables para el cultivo de células de levaduras metilotróficas conteniendo en su genoma un gen codificante para una proteína heteróloga, son conocidos actualmente en el estado de la técnica.

De acuerdo a la presente invención, el cassette de expresión puede emplearse para transformar células de levaduras metilotróficas, tanto por la técnica de esferoplastos (Cregg, *et al*, 1985), por electroporación (Simon y McEntee, 1990) y por el sistema de transformación de

cloruro de litio (Ito et al, 1984). Sin embargo, para el propósito de la presente invención los métodos de electroporación y esferoplastos son preferidos.

Células transformadas positivas pueden ser caracterizadas por análisis de PCR ó "Southern blot" para corroborar la integración del fragmento de ADN. Para el análisis de la expresión del ADNc de HGH inducible con metanol se puede emplear la técnica de retrotranscripción acoplada a PCR ó la de "Northern blot"; y para el análisis del producto, con la presencia de HGH secretada hacia el medio de cultivo, verificable por técnicas electroforéticas o inmunológicas.

Cepas transformadas que contengan el fenotipo y genotipo deseado son cultivadas en fermentadores para la producción a gran escala del producto recombinante. Una fermentación en lote en tres etapas es normalmente preferida para el protocolo de fermentación, éste ya es conocido en el estado de la técnica (Clare, et al, 1991; y Brierley, et al, 1991).

El término "cultivo" significa una propagación de células en un medio que conduce a su crecimiento y todos los subcultivos consecuentes. El término "subcultivo" se refiere a cultivos de células crecidas de células de otros cultivos (cultivo madre) o cualquier subcultivo del cultivo madre, dependiendo del número de subcultivos que hayan sido desarrollados entre el subcultivo de interés y el cultivo madre.

De acuerdo con las preferencias referidas de la presente invención, el sistema de expresión de proteínas heterólogas usado para la expresión del ADNc de HGH emplea el promotor derivado del gen metanol regulable AOX1 de *P. pastoris*, el cual es expresado de forma muy eficiente y regulado de forma precisa. Este gen puede ser también la fuente de la secuencia de terminación de la transcripción. El cassette de expresión preferido en el presente invención comprende, funcionalmente asociado uno con otro, el promotor AOX1 de *P. pastoris*, la secuencia de ADN codificante para la secuencia pre-pro del factor alfa (incluyendo la secuencia de ADN codificante para el sitio de procesamiento: lys-arg), la secuencia codificante para la HGH madura y un terminador de la transcripción derivado del gen AOX1 de *P. pastoris*, preferiblemente dos o más del cassette de expresión mencionado, constituidos por un fragmento de ADN, en orientación cabeza-cola, para rendir un cassette de expresión múltiple en un único fragmento de ADN. En la presente invención se da preferencia a las células hospederas transformadas con el cassette de expresión y de las cuales se prefiere a *P. pastoris*, teniendo por lo menos una mutación que puede ser complementada con un gen marcador de selección presente en el fragmento de ADN transformante. La cepa mutante auxotrófica de *P. pastoris* His4- (GS 115, ATCC20864) ó ARG4- (GS 190) son preferidas. El fragmento conteniendo el cassette de expresión es insertado dentro de un plásmido conteniendo un gen marcador, el cual complementa el hospedero defectuoso y de forma

opcional contiene secuencias adicionales tales como genes marcadores para bacterias y secuencias génicas de levaduras que dirigen la integración del vector.

Para el desarrollo de cepas de *P. pastoris* Mut- (Mut se refiere al fenotipo que emplea metanol) el ADN que comprende el cassette de expresión para transformar las levaduras es integrado preferiblemente dentro del genoma de la levadura por una técnica de recombinación por reemplazamiento. El vector de expresión es digerido con una enzima apropiada para rendir un fragmento de ADN lineal cuyos extremos son homólogos al *AOX1 locus*. Como un resultado de reemplazamiento del gen, son obtenidas cepas Mut-. En cepas Mut-, el gen *AOXQ* es reemplazado por el cassette de expresión y por lo tanto en esta cepa decrece su habilidad de emplear al metanol. Una velocidad de crecimiento lenta es mantenida con metanol debido a la expresión del producto del gen *AOX2*. Las células transformadas que tienen integrado el cassette de expresión dentro del locus *AOX1* (por recombinación sitio dirigida) pueden ser identificadas en un primer tamizaje por la presencia del gen complementador. Este es de preferencia detectado por el crecimiento de las células en medios careciendo del producto del gen complementador e identificando aquellas células capaces de crecer gracias a la expresión de este gen. Además, las células seleccionadas son tamizadas por su genotipo Mut creciéndolas en presencia de metanol registrando la velocidad de su crecimiento o bien empleando técnicas de PCR.

En el desarrollo de cepas Mut+ que expresan el ADNc de HGH, el fragmento que contiene uno o mas cassette de expresión es integrado de preferencia dentro del genoma del hospedero por transformación del hospedero con un plásmido circular o un plásmido lineal que contiene el cassette. La integración es por adición a un *locus* (o *loci*) teniendo homología con una o mas secuencias presentes en el vector de transformación.

Levaduras metilotróficas transformadas, las cuales son identificadas al tener el genotipo y fenotipo deseados, son cultivadas en fermentadores. Es preferido el uso de procesos de producción en tres etapas como se describió anteriormente. Los niveles de HGH secretada en el medio pueden ser determinados por análisis de Western blot, radioinmunoensayo ó ELISA en el medio, y en paralelo con estándares de HGH, usando antisueros antiHGH. También, por análisis electroforético ó por HPLC, después de un tratamiento previo adecuado del medio. La invención será ahora descrita con mas detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

De acuerdo con la presente invención se ha construido un fragmento de ADN conteniendo al menos una copia de un cassette de expresión el cual contiene en la dirección del marco de lectura de la transcripción las siguientes secuencias de ADN:

i) una región promotora de un gen inducible con metanol de una levadura metilotrófica;

ii) una secuencia de ADN que codifica para:

a) la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* incluyendo el sitio del procesamiento proteolítico: lys-arg;

b) el polipéptido de 191 aminoácidos correspondiente a la hormona de crecimiento humano madura; y

c) una porción de ADN sintético adaptador que permite reconstituir secuencias (a) y (b), asegurando su óptima integración y funcionalidad.

iii) una secuencia de terminación de la transcripción funcional en una levadura metilotrófica, de donde las llamadas secuencias de ADN están asociadas de forma funcional unas con otras para llevar a cabo la transcripción de las secuencias que codifican al polipéptido mencionado.

De acuerdo con otro apartado de la presente invención, se construyó un vector de expresión conteniendo al menos una copia del cassette de expresión como se describió anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la siguiente invención, se ha provisto de nuevas cepas de levaduras metilotróficas, particularmente la cepa ATCC con certificado de depósito de microorganismos No. ATCC 74398 conteniendo en su genoma al menos una copia del fragmento de DNA arriba descrito.

Cultivos viables de células de levaduras metilotróficas capaces de producir HGH recombinante están también dentro del ámbito de la presente invención.

Se entenderá que polipéptidos de HGH deficientes en uno o más aminoácidos de la secuencia aminoacídica reportada en la literatura presente en la forma natural de HGH, ó polipéptidos conteniendo aminoácidos adicionales o polipéptidos en los cuales uno o mas aminoácidos de la secuencia aminoacídica de la forma natural de HGH son reemplazados por otros aminoácidos, se encuentran contemplados en el alcance de la presente invención, como por ejemplo todas las variaciones alélicas y no alélicas pero genéticamente relacionadas a HGH, tales como las HGHs de origen placentario, las isoformas de HGH (20kDa) y las GHs de otras especies animales con alto grado de homología en su secuencia nucleotídica y funciones biológicas semejantes; además como es especificado arriba, derivados obtenidos por modificaciones simples de la secuencia aminoacídica de la HGH natural a través de mutagénesis sitio dirigida u otros procedimientos estándares. Formas de HGH producidas por proteólisis en las células hospederas que exhiben actividad biológica similar que HGH madura también son incluídas por la presente invención.

## EJEMPLOS

## EJEMPLO 1. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pPIC9hGH22K

La construcción del vector de expresión descrito en la presente invención, es llevada a cabo de la siguiente manera:

5        Se aísla el fragmento *Xba* I-*Sma* I de 563 pb a partir del vector pJT mostrado en la figura 1, que contiene una versión modificada por mutagénesis dirigida de la secuencia del ADNc codificante para la hormona del crecimiento humano hGHADNc. El fragmento de 563 pb es portador de los codones 8 al 191 de la HGH madura, además de contener 12 nucleótidos de la región no traducible en su extremo 3' hasta el sitio natural *Sma* I.

10        El vector de expresión pPIC9 de *Pichia pastoris*, mostrado en la figura 2, descrito en las patentes americanas publicadas No. 4,882,279; 4,855,231 y 4,808,537 y que contiene la región promotora del gen AOX1 ubicado en el nucleótido 763, seguido por la secuencia codificante de la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* desde el nucleótido 949 al 1218 (esta secuencia contiene el sitio de procesamiento proteolítico lys-arg en el nucleótido 1201 al 1203  
15 y el sitio del reconocimiento glu-ala (1204-1206), éste a su vez seguido del sitio de clonación múltiple (1192-241), una secuencia de terminación de la transcripción AOX1 (1253-1586), un codon de terminación del extremo 3' de la secuencia de terminación de la transcripción del gen AOX1 (1246), es cortado con las enzimas *Xho* I y *Sna* BI. El vector pPIC9 tratado con *Xbo* I y *Sna* BI (1193-1218) pierde 11 nucleótidos (1193-1203) del extremo 3' de la codificante para la  
20 secuencias pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*, justo hasta el sitio de procesamiento proteolítico: lys-arg. Para la reparación de los 11 nucleótidos removidos de la secuencia señal del factor alfa y completar los 7 codones faltantes desde el primer codon, fenilalanina, de la hormona del crecimiento humana madura, se empleó un fragmento de ADN sintético (figura 3) conteniendo los sitios *Xho* I y *Xba* I para facilitar la unión de los fragmentos antes  
25 mencionados.

El plásmido pPIC9 digerido con *Xho* I y *Sma* BI, el fragmento de 563 pb obtenido de pJT, y un adaptador sintético, se pusieron en una misma reacción de ligación, posteriormente con una alícuota de la reacción de ligación se transformaron células de *E. coli* para su propagación y posterior análisis de las clonas para detectar a las portadoras del plásmido  
30 pPIC9hGH22k.

a) Preparación de los plásmidos pPIC9 y pJT.

Células calcio-competentes de *E. coli* TOP 10F' (Invitrogen, Co. San Diego Ca, EUA) fueron transformadas con los plásmidos pPIC9 y pJT. La preparación de bacterias calcio-competentes así como la transformación se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos  
35 por Sambrook y cols (1989). Posteriormente se levantaron colonias de bacterias portando el

plásmido pPIC9 o pJT y se cultivaron en 1L de caldo LB (Tryptona 1%, Cloruro de Sodio 0.5% y Dextosa 1%) para después realizar aislamiento de ADN plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1988). De esta manera se obtuvo una fuente de plásmidos de buena calidad para  
5 llevar a cabo la construcción del plásmido pPIC9hGH22k.

b) Preparación de fragmentos para ligación y reacción de ligación.

La digestión de pJT con la enzima *Xba* I se llevó a cabo con la siguiente mezcla de 50L de reacción: 2µL *Xba* I (10U/µL), 5 µL solución amortiguadora 10X, 5µL albumina serica bovina (ASB) 10X, 13µL ADN (pJT 600 ng/µL), 25µL Agua Milli-Q2.

10 La reacción se efectuó a 37°C durante 5 h y después se agregaron 2 µL de la endonucleasa *Sma* I (10U/µL) y se incubó durante toda la noche a 25°C.

La digestión pPIC9 con las endonucleasas *Xho* I y *Sna* BI se realizó de la siguiente manera: primero se llevó a cabo el corte con la enzima *Sna* BI incubando a 37°C por 5 h con la siguiente mezcla de reacción: 5µL de *Sna* BI (4 U/µL), 5 µL buffer 10X, 5µL ASB 10 X, 15µL  
15 ADN (pPIC9 800 ng/µL) y 20mL agua Milli-Q. Posteriormente se agregaron 2 µL de la endonucleasa *Xho* I (10 U/µL) y se incubó durante toda la noche a 37°C.

El éxito de las digestiones se verificó por análisis de alícuotas de 1µL mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez concluidas las digestiones preparativas antes mencionadas, se llevó a cabo la electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% con 25µL  
20 de cada reacción de digestión y se realizó una tinción con bromuro de etidio (2µg/mL en TBE (amortiguador Tris-borato-EDTA). Los fragmentos de 563 pb de la digestión de pJT con *Xba* I y *Sma* I y de 7966 pb de la digestión de pPIC9 con *Xho* I y *Sna* BI, fueron recuperados del gel cortando las bandas correspondientes con ayuda de un bisturí. Estos se extrajeron de la matriz de agarosa utilizando la técnica de "Geneclean" (The Geneclean II Kit Bio 101, Inc., Ca, EUA) y  
25 se almacenaron en amortiguador TE (Tris-EDTA) a -20°C hasta su empleo. El adaptador sintético empleado se construyó a partir de oligonucleótidos sintéticos complementarios que fueron proporcionados en cadena sencilla, para lo cual se empleó un sintetizador Oligo-1000 (Beckman) para su síntesis. Previo a la reacción de ligación, éstos fueron apareados por complementariedad de bases de la siguiente manera: se llevó a cabo la mezcla conteniendo:  
30 5µL de amortiguador TE 10 X, 3.3µL de NaCl 150 mM, 21µL del oligonucleótido 1 (0.74mM) y 21µL del oligonucleótido 2 (0.70µM), dando lugar a una solución de NaCl 10mM, Tris-HCl 10mM, y EDTA 1mM, se calentó la mezcla a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente y se almacenó a -20°C hasta su uso.



La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción molar 1:8:40 (fragmento de 7996 pb: fragmento de 563 pb: adaptador 30 pb). La ligación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para visualizar la ausencia de los fragmentos de ligación (7996 y 563 pb) y la presencia de bandas de mayor peso molecular. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* TOP 10F' con una alícuota de 5µL de producto de ligación usando bacterias calcio-componentes.

c) Análisis de clonas portadoras de pPIC9hGH22K

De las colonias obtenidas de la transformación (resistentes a ampicilina) se levantaron 20 para su inoculación individual en tubos con 4mL de caldo LB con ampicilina (100mg/L). Se incubaron a 37°C y a 250rpm durante 18 horas. Posteriormente se tomaron 2 mL de cada cultivo y se realizó aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreparación) de acuerdo al método descrito por Sambrook y cols (1989). El ADN plasmídico aislado de cada una de las clonas fue tratado con la endonucleasa *Xba* I, para detectar el plásmido pPIC9HGH22K, el cual debería presentar fragmentos específicos de 7210 y 1377 pb, debido a que dicha enzima corta en las posiciones 1222 y 2599. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para analizar las digestiones. Las clonas que mostraron el patrón esperado fueron caracterizadas más exhaustivamente, realizando digestiones con cada una de las siguientes endonucleasas: *Xho* I, *Xho* I + *Eco* RI, *Xba* I, *Pvu* II y *Bgl* II. Los fragmentos teóricos según el análisis computacional alimentado con la secuencia del plásmido pPIC9HGH22K, se muestra a continuación: *Xho* I (8587 pb), *Xho* I + *Eco* RI (7990 y 597 pb), *Xba* I (7210 y 1377 pb), *Pvu* II (4875, 2948, 497 y 267 pb), *Bgl* II (4574, 2403 y 1616 pb).

Se seleccionó una de las clonas que presentó el patrón de restricción esperado y se realizó preparación ADN plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1988). De esta manera se obtuvo una fuente de plásmido de buena calidad para llevar a cabo la transformación de *Pichia pastoris*.

De la transformación de *E. coli* con 5µL del producto de ligación se obtuvieron 300 colonias de las cuales fueron tomadas 20 para determinar las portadoras del plásmido recombinante (pPIC9HGH22K). Tres de ellas resultaron poseer el plásmido que generaba los fragmentos específicos esperados al ser digerido con la endonucleasa *Xba* I (7210 y 1377 pb). La caracterización exhaustiva del ADN plasmídico de una de las clonas seleccionadas, con las endonucleasas *Xho* I, *Xho* I + *Eco* RI, *Xba* I, *Pvu* II y *Bgl* II, mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados según su mapa de restricción.

EJEMPLO 2. TRANSFORMACION *Pichia pastoris*

Una vez asegurada la identidad del vector pPIC9HGH22K se realizaron digestiones para linearizar el plásmido con las endonucleasas *Sac* I y *Stu* I y de esta manera llevar a cabo la transformación. El plásmido linearizado con *Sac* I favorece la inserción génica en el locus *AOX1* y el plásmido linearizado con *Stu* I la inserción génica en locus *His4* (Invitrogen, 1994), desarrollando de esta manera cepas Mut<sup>+</sup> en ambos casos. Las células de *Pichia pastoris* GS 115 (ATCC20864) fueron transformadas por electroporación (Simon y McEntee, 1990) con los plásmidos linearizados como se describe a continuación: las células de *Pichia pastoris* se cultivaron en 50mL de caldo YPD a 30°C y 250rpm hasta llegar a la fase logarítmica tardía (DO<sub>600</sub> 2.0). Luego se centrifugó a 5000rpm por 5 min (centrifuga IEC Centra MP4R Rotor 854) para obtener el paquete celular, el cual se lavó dos veces, primero con 25 mL de agua Milli-Q estéril y después con 2 mL de sorbitol 1M estéril, y se resuspendió en 0.5 mL del mismo (DO<sub>600</sub> =2.0). Se mezclaron 20µL de esta suspensión celular con 5µL del ADN lineal (50ng/µL), se transfirió a las micro-cámaras de electroporación de 0.15cm y se llevó a cabo la electroporación con un pulso de 400V, 10µF y un campo de fuerza de 2666.6V/cm. Se tomaron 10µL de la mezcla de electroporación y se le añadieron 0.5µL de sorbitol 1M estéril. Posteriormente se distribuyó el contenido del tubo Eppendorf en placas con medio mínimo con dextrosa (MD, base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>%, dextrosa 1%) y se incubó a 30° C hasta la aparición de las colonias (3-6 días). Ya que el medio MD carece de histidina, solamente crecen las levaduras que hayan integrado el plásmido en su genoma y que por lo tanto son capaces de sintetizar histidina (His<sup>+</sup>). Posteriormente se levantaron colonias de ambas preparaciones y se llevaron a conservación para su posterior análisis.

La transformación de *Pichia pastoris* con los dos plásmidos linearizados dió como resultado 54 clonas transformadas con el plásmido cortado con *Sac*I y 33 clonas transformadas con el plásmido cortado con *Stu* I. Las clonas obtenidas presentan un fenotipo His<sup>+</sup> (capacidad de sintetizar histidina) debido a haber crecido en un medio sin histidina, adquirido por la integración del plásmido.

Las clonas resultantes de la transformación con ambas preparaciones (digestiones con *Sac* I y *Stu* I) se cultivaron en tubos con 4mL de caldo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) durante 48h a 30 °C y agitación a 250rpm. Posteriormente se obtuvo la pastilla celular por centrifugación a 16000g (14000 rpm centrifuga Eppendorf 5402) durante 5 minutos, se resuspendió en YPD con 15% de glicerol en un volumen tal que tuviera una DO<sub>600</sub> de entre 50 y 100, se llevaron a congelación rápida en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -70°C (Izquierdo, 1993).

### EJEMPLO 3. ANALISIS DEL ADN GENOMICO DE TRANSFORMANTE

#### a) Preparación del ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de *P. pastoris*, se empleó una modificación a la técnica de TSNT (M. Izquierdo, 1993). Las levaduras crecieron en 4mL de caldo YPD durante 24-48h, se cosechó el paquete celular por centrifugación durante 5 minutos a 16000g y se lavó con 500µL de agua Milli-Q. Al paquete celular se le agregaron 300µL de solución de TSNT (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1% NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM, pH=8) y 650µL de fenol saturado y se mezcló en vortex durante 10s. Posteriormente se agregaron 150µL de Sevag (cloroformo: alcohol isomílico 1:1) y se agitó durante 5 minutos. Una vez concluida la agitación se añadieron a la mezcla 300µL de TE pH=8 y se procedió a centrifugar por 10 min a 16000g, se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga de 2mL y se precipitó el ADN agregando 1.3 mL de etanol al 100%. Se centrifugó por 10 min a 16000g y se decantó el sobrenadante, la pastilla de ADN se resuspendió en 500µL de fenol-sevage, se separó la fase acuosa por centrifugación durante 5 min y 16000g. Se añadieron 10 µL de acetato de amonio 7.5M y 1.3mL de etanol al 100% para precipitación del ADN, se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 16000 g para decantar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con etanol al 70% y se resuspendió en 50µL de TE, solución a la cual se le realizó medición espectrofotométrica para cuantificación de ADN y determinación del parámetro de calidad ( $A_{260}/A_{280}$ ). También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE y tinción con bromuro de etidio para verificar si los ADN's genómicos no se encontraban degradados.

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico de seis clonas fue analizado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar la identidad del plásmido pPIC9hGH22K así como su integración en el genoma de *P. pastoris*. El iniciador del extremo 5'(5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') se aparea en la región 5'AOX1 (nucleótido 855-875) del plásmido pPIC9, el iniciador del extremo 3'(5'-GCAATGGATTCTGACATCC-3') se aparea en la región 3' AOX1 TT (nucleótido 1327-1347) del mismo. Ya que la PCR de l plásmido pPIC9 resulta en un producto amplificado de 449 pb y el sitio de multiclonación (MCS) de pPIC9 se encuentra entre las dos regiones de apareamiento de los iniciadores, el fragmento clonado causa un aumento del tamaño del producto amplificado en 567 pb generando un fragmento de 1016 pb para pPIC9hGH22K. La PCR del ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante da por resultado un producto de 2200 pb proveniente de la amplificación del gen AOX1. La PCR de ADN genómico de clonas (*P. pastoris* recombinante) que conservan el gen AOX1 (Mut+), da por resultado productos de 2200 y 1016 pb correspondientes al gen AOX1 y al cassette de integración respectivamente.

Se llevó a cabo la estandarización de la PCR con el objetivo de obtener bandas nítidas y lo mas lejano posible a la saturación para detectar multicopias del cassette de expresión en

caso de haberlas. Para la estandarización se emplearon diferentes concentraciones de ADN molde e iniciadores, también se varió el número de ciclos. La PCR estandarizada tuvo las siguientes condiciones: amortiguador de PCR (Promega) 1 X, ADN genómico 2ng/L, dNTP's 200µM, iniciador 5'AOX1 0.5µM, iniciador 3' AOX1 0.5µM, agua estéril y 2.5 unidades de Taq polimerasa en 25µL de reacción. Se empleó un termociclador PTC-150 (MJ Research), el programa llevado a cabo fue el siguiente: una etapa inicial de desnaturalización del ciclo a 94°C (2 min), una etapa de 18 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), alineación a 60°C (1 min) y extensión a 72°C (1 min) y una última etapa de extensión a 72°C (7 min). Se realizó el análisis de 5µL del producto de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE.

Debido a que las clonas Mut+ siempre cuentan con una sola copia del gen AOX1, la relación de la intensidad entre las bandas amplificadas (2200 pb y 1016 pb) resulta igual en diferentes clonas que contienen una sola copia del plásmido integrado. Considerando que la mayoría (99% aproximadamente) de las clonas de *P. pastoris* tendrían una copia del plásmido integrado, estas presentarían la misma relación de la intensidad de las bandas amplificadas.

Por lo tanto las clonas con multicopias del plásmido integrado serían fácilmente detectables debido a que se distinguirían de entre la mayoría de clonas de una sola copia al cambiar la relación de intensidad entre ambas bandas (2200 pb/1016 pb), debido al aumento de la intensidad de la banda de 1016 o banda recombinante. Por lo tanto se realizó un análisis densitométrico de las bandas de PCR teñidas con bromuro de etidio para determinar la existencia de clonas con multicopias del plásmido integrado o si solo se contaba con clonas con una sola copia.

El tamaño de cada uno de los productos amplificados obtenidos por la PCR, correspondieron a los tamaños esperados para cada uno de los ADN's moldes empleados: pPIC9 (449 pb), pPIC9hGH22K (1016 pb), ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante (2200 pb), clonas recombinantes Mut+ de *P. pastoris* (1016 y 2200 pb). En la figura 3 se muestran cada uno de los productos amplificados, separados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. En el carril M se muestra el marcador de peso molecular (lambda, Eco RI-Hind III), en el carril A se muestra el producto amplificado de pPIC9, en el carril B se encuentra el producto amplificado de pPIC9hGH22K, en el C se muestra el producto amplificado de ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante, los carriles 1 al 6 representan productos amplificados de diferentes clonas recombinantes Mut+ de *P. pastoris*. También se muestra la relación de intensidad entre la banda de 2200 pb y 1016 pb para cada clona recombinante y tiene una media de  $0.996 \pm 0.041$  ( $X \pm E.S., n=6$ ), lo que demuestra que cada una de estas clonas tiene solo una copia del cassette de expresión integrado.

EJEMPLO 4. PRODUCCION DE HGH MEDIANTE CLONAS RECOMBINANTES DE  
*P. pastoris*

a) Fermentaciones

Se seleccionaron cuatro clonas preparadas mediante los ejemplos 1 a 3, dos por cada una de las transformaciones (ADNs digeridos con Sac I y Stu I). Cada una de las clonas fueron inoculadas del medio de conservación (viales con 15% de glicerol a -70°C) a placas con agar YPD (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) llevando a cabo una estría en tres campos con el fin de obtener colonias aisladas. Como ya se mencionó las fermentaciones con *P. pastoris* recombinante se dividen en dos fases, la fase de crecimiento celular y la fase de inducción o producción de proteína recombinante. A partir de colonias aisladas se inocularon 4 matraces Erlenmeyer de 250mL con 25 mL de medio amortiguado y con glicerol (IBMG, fosfato de potasio dibásico 100mM pH=6, base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ , glicerol 1%) y se incubaron a 30°C en agitación (250rpm) hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 4.0. Con 3.125mL de este cultivo propagado se inocularon 22mL de medio BMG contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250mL para alcanzar una  $DO_{600}$  inicial de 0.5, se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 1.0. Posteriormente se eliminó el medio BMG por centrifugación (5000 rpm 5 min, centrífuga IEC Centra MP4R rotor 854) y se resuspendió en 25mL de medio amortiguado y con metanol (BMM, fosfato de potasio dibásico 100mM, pH=6, base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ , metanol 0.5%). Se continuó la incubación a 30°C y 250rpm durante 150h y de esta manera se inició la etapa de inducción o producción de la proteína recombinante. Se añadió 125µL de metanol cada 24 h para compensar la pérdida por evaporación. Posteriormente se realizó SDS-PAGE e inmunodetección por la técnica de "Western blot" de HGH recombinante del medio de cultivo libre de células, para determinar la identidad de la misma.

b) Análisis de proteínas (determinación de proteínas, SDS-PAGE y densitometría)

Debido a que en este sistema la HGHr es secretado al medio de cultivo, se realizó análisis de proteínas del medio de cultivo, el cual fue dializado contra agua Milli-Q antes del análisis. Las bolsas de diálisis con 25mL de medio permanecieron en un vaso de precipitados con 4L de agua fría durante 1.5 h, con agitación moderada y se realizaron dos cambios mas del agua Milli-Q. El medio dializado se concentró de la siguiente manera: se agregaron cuatro volúmenes de una solución metanol:acetona (1:1), se dejó a -20°C toda la noche, se centrifugó 10min. a 10,000rpm (centrífuga IEC Centra Mp4R, rotor 854), se eliminó el sobrenadante y se secó al vacío el paquete de proteínas. El paquete se resuspendió en 1/20 de su volumen original de buffer SDS-PAGE, se calentó durante 10 min. a 100°C, se centrifugó por 5 segundos para baja el líquido evaporado y condensado en las paredes del tubo y se aplicaron

de 10-20µL para la electroforesis en gel de poliacrilamida. La separación de proteínas se realizó por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida 8gel separador al 12% y un gel concentrador de acrilamida al 4%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se aplicó un voltaje inicial de 80V hasta que el colorante penetró en el gel concentrador  
5 aproximadamente 1cm, y luego se incrementó éste a 140V, se mantuvo la electroforesis hasta que el colorante llegó al gel separador y finalmente se incrementó a 180V. El gel se fijó con una solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, en agua desionizada) y se agitó a 40rpm durante 25 min., se retiró la solución colorante y se añadió solución decolorante (metanol 5% v/v, ácido acético 7% v/v, en agua desionizada) agitando a 40rpm durante 1h. El  
10 gel se continuó decolorando con cambios periódicos de la solución decolorante, hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel.

El porcentaje relativo de la proteína resultante de la fusión entre la HGH y la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en los extractos celulares se determinó por densitometría en gel, basándose en la medición de la intensidad del color de las bandas obtenidas. El equipo  
15 empleado fue un densitómetro Zeineh Soft Laser (Scanning Densitometer, Modelo SLR-2D/ID, Biomed Instruments, Inc.) con Zeineh Programs Universal Software (Advanced American Biotechnology Biomed VGA Programs).

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Martínez, 1993), se empleó un espectrofotómetro para determinar la absorbancia a 595 nm que se presenta por  
20 la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas evaluadas. Se realizaron curvas-de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (ASB, Sigma) en un intervalo de concentración de 1 a 6µg/mL. Tanto las muestras como los estándares fueron preparados por triplicado.

c) Inmunodetección por "Western blot"

25 Se realizó un análisis por SDS-PAGE bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (0.45 micrones Bio-Rad) por 3h a 100V, ésta se incubó 1h con agitación a 40rpm en solución de bloqueo (Tween 20 al 0.3% v/v, albúmina de suero bovino al 0.3% p/v en PBS) para bloquear las áreas libres de proteína en la membrana.

30 Como primer anticuerpo se empleó un antisuero anti-HGH desarrollado en conejo (Sigma) en una dilución 1:1000 en 1% de solución de bloqueo en PBS. Este se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 15 min con agitación moderada con Tween 20 al 0.3% en PBS. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-IgG de conejo desarrollado en cabra (Sigma) en una dilución 1:1000 en 1% de solución de bloqueo en PBS.  
35 Se incubó 1h a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 15 min con agitación

moderada con Tween 20 al 0.3% en PBS. Para el revelado se emplearon 10mL de la mezcla de sustratos cromogénicos que contenía 66µL de nitro-azul de tetrazolio (NBT) al 5% p/v y 33µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato (BCIP) al 5% p/v en amortiguador fosfato alcalino (NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.5). Se añadió a la membrana y se agitó moderadamente hasta la aparición de las bandas de interés (10 min aproximadamente).

Las cuatro clonas recombinantes que fueron analizadas para la caracterización del producto de la expresión del gen heterólogo integrado, produjeron y secretaron HGH recombinante. El análisis electroforético en gel de poliacrilamida del medio de cultivo de una fermentación con una de las clonas de *P. pastoris* mostró que en el medio de cultivo de células inducidas aparece una banda de aproximadamente 22KDa que corresponde a la HGH recombinante, mientras que en el medio de cultivo de células no inducidas, no apareció ninguna banda. También se mostró la inmunodetección de HGH recombinante mediante la técnica de Western blot, empleando anticuerpos anti-HGH.

d) Secuenciación de proteína

Para llevar a cabo el análisis del extremo amino terminal, el medio de cultivo dializado de una fermentación de la cepa de *P. pastoris* recombinante (clona 19) fue resuelto por SDS-PAGE y transferido a un filtro de nitrocelulosa. La banda correspondiente a una proteína de 22KDa, la cual fue inmunoreactiva en ensayos previos a anticuerpos anti-HGH, fue cortada y sujeta a secuenciación de los 15 residuos de aminoácidos del extremo aminoterminal. La secuenciación automatizada se realizó en un secuenciador automático de proteínas empleando la técnica de Edman, posteriormente se separaron los derivados de PTH para su identificación. La secuencia de los 15 residuos de aminoácidos del extremo amino-terminal de HGH recombinante secretada por la clona 19 fue idéntica a la secuencia de la HGH nativa. Implicando con esto, el reconocimiento correcto del sitio de procesamiento para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*.

e) Actividad adipogénica

La actividad biológica de HGH recombinante fue evaluada determinando la capacidad de inducir la diferenciación de células 3T3-F442A/C4 en adipocitos, basándose en las técnicas reportadas previamente. La HGH recombinante secretada por la cepa recombinante de *P. pastoris* (clona 19) presentó actividad adipogénica, aunque 10 veces menor a la observada en la preparación patrón utilizada (HGH recombinante de Genentech). Estos resultados pueden ser debido a que la preparación probada fue un extracto crudo obtenido del medio de cultivo.

EJEMPLO 5. PRODUCCION DE HGH RECOMBINANTE

Fueron analizadas 24 colonias transformadas (18 cortes Sac I y 6 cortes Stu I) para seleccionar la transformante con mas altos niveles de producción de HGH recombinante, empleando condiciones de cultivo preliminares.

Una colonia fue inoculada en 3mL de medio BMG en tubos de 25 mL. Las células se  
5 crecieron a 30°C con agitación a 250rpm hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> entre 2 y 6. Posteriormente se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 10000rpm (centrífuga IEC Centra MP4R, rotor 854) por 5min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en medio BMM (medio inductor) en un volumen tal que resultara una DO<sub>600</sub> de 1.0. Se transfirieron 3 mL del medio ajustado a tubos estériles y se incubó a 30°C por 150h para inducir la expresión del  
10 gen heterólogo (hGH). Para mantener la inducción se agregó metanol al 100% cada 24h a una concentración final de 0.5%. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10,000 rpm (centrífuga IEC Centra MP4R, rotor 854), para separar la pasta celular del medio de cultivo y realizar análisis de proteínas en el medio de cultivo. Se realizó determinación de proteínas totales de las 24 clonas transformadas y porcentaje de HGH recombinante por densitometría  
15 de geles de 7 de las clonas transformadas con los niveles mas altos de proteínas totales. Con los valores obtenidos de estos parámetros se calculó la concentración alcanzada expresada como mg de HGHr/L de medio de cultivo.

La concentración de proteínas totales del medio de cultivo de las 24 clonas analizadas tiene una variación de entre 3 a 11mg/L. Los porcentajes de HGH recombinante obtenidos por  
20 densitometría de geles de poliacrilamida de las 7 clonas con mayores niveles de proteínas varían del 35 al 80%. La producción de HGH recombinante (mg/L) en estas 7 clonas tuvo valores de 3 a 9mg de HGH recombinante/L de medio de cultivo. La clona que alcanzó los niveles mas altos de producción de HGH recombinante (9 mg/L), fue la que se empleó para llevar a cabo la producción a nivel matraz.

#### 25 EJEMPLO 6. ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCION DE HGH RECOMBINANTE CON *Pichia pastoris*

Esta etapa consistió en producir HGH recombinante con una clona seleccionada de *P. pastoris* recombinante.

La cepa de *P. pastoris* que produjo mas altos niveles de HGHr (80% y 9 mg/L) en tubos  
30 de ensayo, fue empleada para la producción de HGHr. En esta etapa de la producción extracelular de HGHr se realizaron un total de 7 pruebas modificando las variable de producción:

- concentración de metanol (inductor) en medio de cultivo (%)
- densidad óptica al inicio de la inducción (DO600)
- 35 - tiempo de inducción (TI).



El indicador de producción fue la concentración de HGH recombinante en el medio de cultivo, la cual se obtuvo a partir de los parámetros evaluados (% de HGH recombinante y la concentración de proteínas totales mg/L). De esta manera el resultado obtenido se expresó en mg de HGH recombinante/L de medio de cultivo. Los factores empleados para la producción, así como los valores de porcentaje de HGHR, proteínas totales y los niveles de producción de HGHR.

En la tabla que se muestra a continuación se observa que la variación de los factores respecto a los ensayos realizados muestran que la concentración de metanol se incrementó durante la producción, mientras la DO<sub>600</sub> y el TI mostraron valores oscilantes. La DO<sub>600</sub> fluctuó entre 0.91 y 1.43, la concentración de metanol entre 0.25 y 1.36% v/v, el TI entre 140 y 186h.

ENSAYO	%M	DO <sub>600</sub>	TI(h)	PT (mg/L)	% DE HGHR	HGH (mg/L)
ETAPA I						
A	0.25	1.43	140	4.9	27.3	1.3
B	0.251	1.10	175	10.8	64.1	6.9
C	0.75	1.08	140	16.5	76.2	12.6
D	0.75	1.38	175	15.9	82.2	13.1
ETAPA II						
CI	0.75	0.94	140	16.2	78.9	12.8
E	0.92	0.91	186	14.0	76.6	10.8
ETAPA III						
E1	0.92	0.97	186	12.1	68.9	8.4
F	1.36	1.07	160	18.6	48.6	9.1
ETAPA IV						
C2	0.75	1.26	140	13.8	55.7	7.7
G	1.06	1.37	166	7.7	31.1	2.4

M= metanol; DO= densidad óptica; TI= tiempo de inducción; PT= proteínas totales

Asimismo, el porcentaje relativo de HGHR fluctuó entre 31 y 82% mostrando valores oscilantes, mientras que la concentración de proteínas totales fluctuó entre 4.9 y 18.6mg/L y mostró un incremento durante la producción, aunque en el último ensayo se observa una disminución. La producción de HGHR fluctuó entre 1.3 y 13, mostrando un incremento y luego disminución. El ensayo (D) resultó ser el mejor tal como se muestra en la tabla. Este presentó una concentración de proteínas totales de  $15 \pm 0.6$  mg/L ( $X \pm E.S.$ ,  $n=3$ ) con un porcentaje de 80.7%, lo que se traduce en una producción de HGHR de  $12.3 \pm 0.7$  ( $X \pm E.S.$ ,  $n=3$ ) y fue 900% mas productivo que el ensayo de menor producción (A). Por lo tanto las condiciones determinadas para alcanzar niveles óptimos de producción de HGHR fueron: DO<sub>600</sub>:1.38, concentración de metanol: 0.75% y TI: 175h.

Habiendo descrito la presente invención, ésta se considera una novedad y por lo tanto se reclama como propiedad lo convenido en las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de ADN conteniendo una o más copias de un cassette de expresión que incluye:

(i) una región promotora de un gen inducible con metanol de una levadura metilotrófica;

(ii) una secuencia de ADN que codifica para:

(a) La secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* incluyendo el sitio del procesamiento proteolítico en lys-arg; y

(b) El polipéptido de 191 aminoácidos correspondiente a la hormona de crecimiento humano (HGH) madura; y

(c) Una porción de ADN sintético adaptador que permite reconstituir las secuencias (a) y (b), asegurando su óptima integración y funcionalidad.

(iii) una secuencia de terminación de la transcripción funcional en *Pichia pastoris*; donde:

la secuencia de ADN que codifica para la secuencia pre-pro del factor alfa y la secuencia del ADNc de HGH se encuentran funcionalmente asociadas de tal manera que bajo un proceso de transcripción y traducción, HGH madura biológicamente activa es secretada hacia el medio de cultivo;

el promotor y la secuencia de terminación se encuentran funcionalmente asociados con la secuencia de ADN codificante para el polipéptido antes mencionado;

la región promotora dirige la transcripción de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido por inducción con metanol en *Pichia pastoris*; y

la levadura metilotrófica es una especie, la cual pertenece a los géneros: *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis*; que emplean al metanol como única fuente de carbono.

2. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, que además comprende por lo menos un gen marcador de selección y un origen de replicación para bacterias.

3. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, de donde la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido HGH madura que tiene la secuencia:

phe pro thr ile pro leu ser arg leu phe asp asn ala met

-5 1 5 10

leu arg ala his arg leu his gln leu ala phe asp thr tyr gln glu phe glu glu ala

15 20 25 30

tyr ile pro lys glu gln lys tyr ser phe leu gln asn pro gln thr ser leu cys phe

35 40 45 50

ser glu ser ile pro thr pro ser asn arg glu glu thr gln gln lys ser asn leu glu

55 60 65 70

- 25 -

leu leu arg ile ser leu leu leu ile gln ser cys ala gly ala val gln phe leu arg  
 75                      80                      85                      90  
 ser val phe ala asn ser leu val tyr gly ala ser asp ser asn val tyr asp leu leu  
 95                      100                      105                      110  
 5    lys asp leu glu glu gly ile gln thr leu met gly arg leu glu asp gly ser pro arg  
 115                      120                      125                      130  
 thr gly gln ile phe lys gln thr tyr ser lys phe asp thr asn ser his asn asp asp  
 135                      140                      145                      150  
 ala leu leu lys asn tyr gly leu leu tyr cys phe arg lys asp met asp lys vl glu  
 10    155                      160                      165                      170  
 thr phe leu arg ile val gln cys arg ser val glu gly ser cys gly phe  
 175                      180                      185                      190

4. Un plásmido que comprende el fragmento del ADN de la reivindicación 3.

5. Las células de levadura de *Pichia pastoris* transformadas por recombinación  
 15 homóloga con el fragmento de ADN de reivindicación 1 y 4.

6. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, de donde la llamada levadura  
 metilotrófica es una cepa de *Pichia pastoris*.

7. El fragmento de ADN de la reivindicación 6, de donde el llamado gen inducible  
 con metanol de una levadura metilotrófica y la secuencia de terminación de la transcripción son  
 20 derivadas del gen AOX1 de *P. pastoris*.

8. El fragmento de ADN de la reivindicación 7, el cual contiene extremos 5' y 3' con  
 homología suficiente con el gen objetivo de una levadura hospedera, para poder dirigir la  
 integración del mencionado fragmento de ADN en el gen objetivo, de donde la levadura  
 hospedera es una especie de *Pichia* que usa al metanol como única fuente de carbono.

9. El fragmento de ADN de la reivindicación 8, conteniendo múltiples copias del  
 llamado cassette de expresión.

10. Las células de *Pichia pastoris* transformadas con el fragmento de ADN de la  
 reivindicación 9.

11. Un cultivo viable de células de *P. pastoris* conteniendo las células de la  
 30 reivindicación 10.

12. Células de *Pichia pastoris* transformadas con el fragmento de ADN de la  
 reivindicación 8 del depósito de microorganismos No. ATCC 74398.

13. Un cultivo de células viables de *P. pastoris* conteniendo las células de la  
 reivindicación 12 y correspondientes al depósito de microorganismos No. ATCC 74398.

14. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, conteniendo múltiples copias del  
 35 llamado cassette de expresión.

15. El fragmento de ADN de la reivindicación 14, de donde las múltiples copias de cassette de expresión están orientadas en una orientación cabeza-cola.

16. Células de levadura de *Pichia pastoris* transformadas con el fragmento de ADN de la reivindicación 14.

5 17. Un proceso para la producción de la hormona del crecimiento humano que comprende el cultivo de células de *Pichia pastoris* de la reivindicación 16 bajo condiciones en las cuales el polipéptido de HGH es expresado y secretado hacia el medio de cultivo.

18. El proceso de la reivindicación 17, de donde las llamadas células son cultivadas en un medio conteniendo metanol como única fuente de carbono.

10 19. El proceso de la reivindicación 17, de donde las mencionadas células tiene el fenotipo Mut+.

20. El proceso de la reivindicación 17, de donde las mencionadas células tienen el fenotipo Mut+-.

15 21. Células de *Pichia pastoris* transformadas con el fragmento del ADN de la reivindicación 1 del depósito de microorganismos No. ATCC 74398.

22. Un cultivo viable de células de *Pichia pastoris*, conteniendo las células de la reivindicación 21 del depósito de microorganismos No. ATCC 74398.

20 23. Un proceso para la producción de polipéptidos de hormona del crecimiento humano, incluyendo los cultivos de las células de *Pichia pastoris* de la reivindicación 21 bajo condiciones en las cuales, el polipéptido de HGH es expresado y secretado hacia el medio de cultivo.

24. El proceso de la reivindicación 23, de donde las mencionadas células son cultivadas en un medio conteniendo metanol como única fuente de carbono.

25 25. El proceso de la reivindicación 23, de donde las mencionadas células poseen un fenotipo Mut+.

26. El proceso de la reivindicación 23, de donde las mencionadas células poseen un fenotipo Mut-.

30 27. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, de donde la región promotora es seleccionada de un grupo de regiones promotoras inducibles con metanol de *Pichia pastoris* consistiendo del promotor del gen del alcohol oxidasa I (AOX1), la región promotora del gen del alcohol oxidasa II (AOX2), la región promotora del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS), el promotor del gen P40 y el promotor del gen de la catalasa que dirigen la transcripción de secuencia de nucleótidos que codifican para el polipéptido, los cuales son inducibles con metanol en *Pichia pastoris*.

1/3

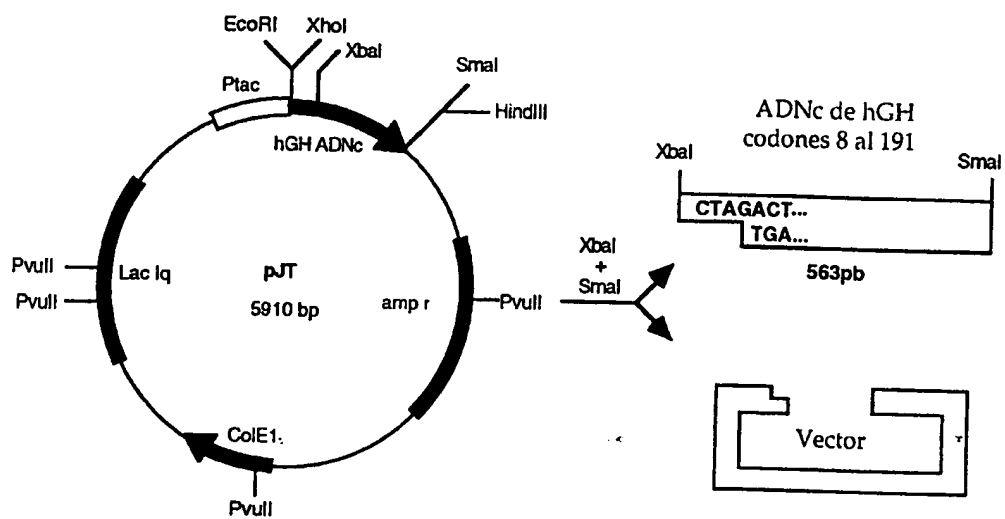


Figura 1

2/3

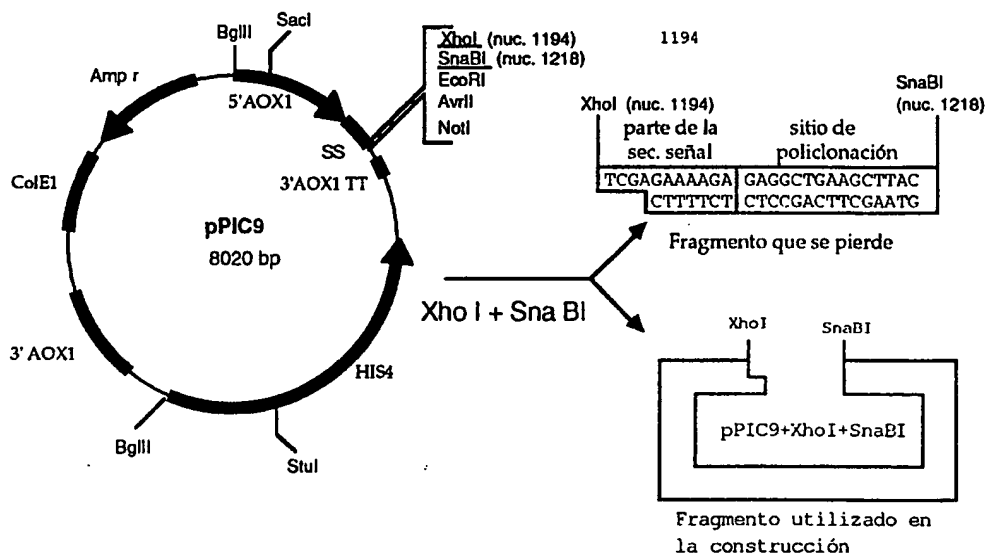
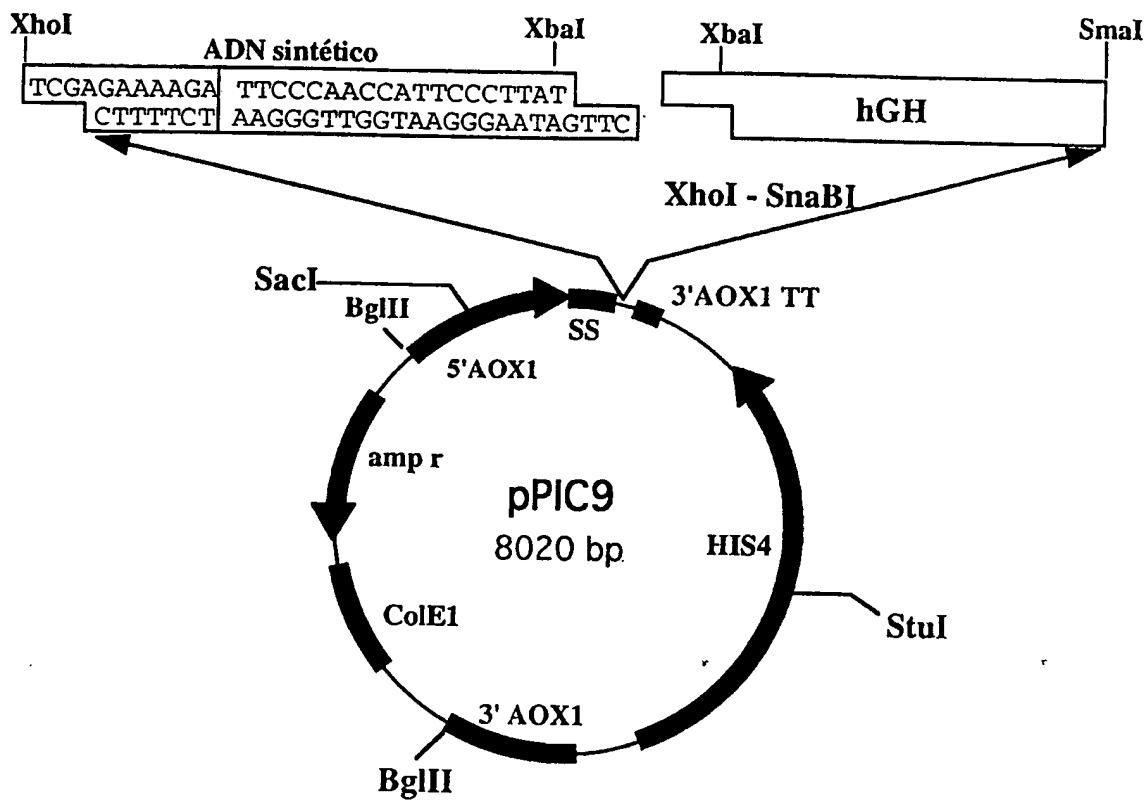


Figura 2

3/3

(A)



(B) Digestión con Stu I

Genoma de *P. pastoris*

(C) Digestión con Sac I

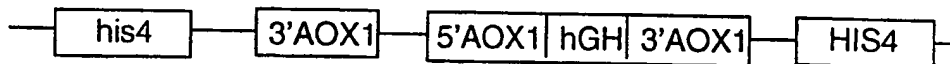
Genoma de *P. pastoris*

Figura 3



**AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION**

12301 Parklawn Drive  
Rockville, Maryland 20852 USA

**PCT/MX 97/0003**

Telephone: 301/231-5519  
FAX: 301/816-4366

**FACSIMILE**

REC'D	09 FEB 1998
WIPO	PCT

Date: November <sup>7</sup>~~5~~, 1996

To: Dra. Martha Guerrero de Viader and  
Dr Hugo A. Barrera Saldana  
Universidad Autonoma de Nuevo Leon

Fax Number: 011-528-333-77-47

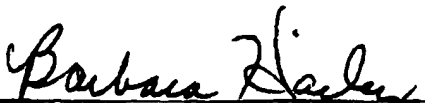
Total number of pages including this page: One (1)

From: ATCC Patent Depository

Reference: Patent Deposit. Recombinant yeast harboring an hGH expression cassette integrated into its genome, GS115hGH22K-01 assigned ATCC 74398. Date of deposit October 22, 1996. Paperwork will be forwarded to you in a few days.

An invoice will be sent under separate cover referencing check received as follows:

One time fee - 30 years	\$ 600.00
Viability Test	100.00
Phone/Fax Charge	<u>10.00</u>
Total amount to ATCC 74398	\$ 710.00
PAYMENT RECEIVED BY CHECK	<u>- 710.00</u>
Balance due to ATCC 74398	\$ - 0 --

  
Barbara M. Hailey, Administrator, ATCC Patent Depository  
Telephone: 301/231-5519

The information contained in this facsimile is intended only for the use of the individual or entity named above. If the reader of this message is not the intended recipient, you are notified that any dissemination or distribution, except to the intended recipient of this communication, is prohibited. If you have received this communication in error, please call us immediately at the telephone number listed above.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX97/00033

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.11, 254.23, 320.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRANKAMP ET AL. Expression of synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghilanten by the methylotropic yeast <i>Pichia pastoris</i> . Protein Expression and Purification. December 1995. Vol. 6, pages 813-820, especially Figure 2 and page 816, second paragraph.	1-27
Y	US 4,342,832 A (GOEDDEL ET AL.) 03 August 1982, entire document, especially Figures 1 and 3.	1-27
Y	US 5,324,639 A (BRIERLEY ET AL.) 28 June 1994, entire document, especially Figures 2 and 4, and last full paragraph of column 11.	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*B* earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

17 MARCH 1998

Date of mailing of the international search report

13 APR 1998

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

CLAIRE M. KAUFMAN

Telephone No. (703) 308-0196

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/MX97/00033

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,102,789 A (SIEGEL ET AL.) 07 April 1992, entire document, especially columns 3, 4, and 10.	1-27
A	EP 0344459 A2 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 06 December 1989, entire document, especially lines 1-35 of page 8.	1-27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/MX97/00033

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 3, 4, 5 (in part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
Please See Extra Sheet.
  
3. ☒ Claims Nos.: 5  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/MX97/00033

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (6):

C07K 14/16; C12N 1/19, 15/09, 15/10, 15/18, 15/63, 15/64, 15/65, 15/67, 15/81; C12P 1/02, 21/02

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.11, 254.23, 320.1

## B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, STN (MEDLINE, EMBASE, CAPLUS, INPADOC)

search terms: methylotrop?, yeast?, cervisi?, pastoris?, alpha(1w)factor, amf, pre-pro, proteolytic?, human growth hormone, olazaran, guerrero m, leal j, saldana h, salvado j

## BOX I. OBSERVATIONS WHERE CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE

2. Where no meaningful search could be carried out, specifically:

Claims 3-5 are unsearchable to the extent that they require reference to the specified sequences. Because Applicant has not furnished a paper copy and machine readable form of the sequence listing as required by PCT Rule 5.2, no meaningful search of the sequence per se can be carried out by this Authority. However, the subject matter of the claims has been searched to the extent possible with reference to the balance of the description.

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/MX97/00033

## A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

**CIP<sup>6</sup>: ver hoja suplementaria**

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

U.S. : 536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.11, 254.23, 320.1

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

ver hoja suplementaria

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	BRANKAMP ET AL. Expression of synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghilanten by the methylotropic yeast Pichia pastoris. Protein Expression and Purification. Diciembre 1995. Volumen 6, páginas 813-820, especialmente figura 2 y página 816, segundo párrafo.	1-27
Y	US 4,342,832 A (GOEDEL ET AL.) 3 Agosto 1982 (03.08.82), todo el documento, especialmente figuras 1 y 3.	1-27
Y	US 5,324,639 A (BRIERLEY ET AL.) 28 junio 1994 (28.06.94), todo el documento, especialmente figuras 2 y 4, y el último párrafo entero de la columna 11.	1-27



En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.



Véase el Anexo de la familia de patentes.

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

17 Marzo 1998 (17.03.98)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

13 Abril 1998 (13.04.98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

Facsímil N° ISA/US

Funcionario autorizado

Teléfono N°

**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional N°

**PCT/MX97/00033**
**C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES**

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	US 5,102,789 A (SIEGEL ET AL.) 7 Abril 1992 (07.04.92) todo el documento, especialmente columnas 3, 4, y 10.	1-27
A	EP 0344459 A2 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 6 Diciembre 1989 (06.12.89), todo el documento, especialmente 1 líneas 1-35 de la página 8	1-27

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/MX 97/00033

## **Recuadro I Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 1 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2)a), por las razones siguientes:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:  
debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente:
  
2. ☒ Reivindicaciones Nos.: **3, 4, 5 (en parte)**  
debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:
  
3. ☒ Reivindicaciones Nos.: **5**  
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).

## **Recuadro II Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:

1. ☐ Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
  
2. ☐ Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
  
3. ☐ Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
  
4. ☐ El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:

**Observación sobre protesta** ☐ Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante.  
☐ Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.

A. CLASIFICACION DEL OBJETO:

CIP(6):

C07K 14/16; C12N 1/19, 15/09, 15/10, 15/18, 15/63, 15/64, 15/65, 15/67, 15/81; C12P 1/02, 21/02

A. CLASIFICACION DEL OBJETO:

US CL:

536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.11, 254.23, 320.1

B. CAMPOS DONDE SE HA EFECTUADO LA BUSQUEDA:

Bases de datos electrónicas consultadas (nombre de la base de datos y terminos utilizados:

APS, STN (MEDLINE, EMBASE, CAPLUS, INPADOC)

terminos buscados: methylotrop?, yeast?, cervisi?, pastoris?, alpha(1w)factor, amf, pre-pro, proteolytic?, human growth hormone, olazaran, guerrero m, leal j, saldana h, salvado j

RECUADRO I. OBSERVACIONES CUANDO SE ESTIMA QUE ALGUNAS REIVINDICACIONES NO PUEDEN SER OBJETO DE BUSQUEDA

2. No pudo efectuarse una búsqueda provechosa concretamente:

Las reivindicaciones 3 a 5 no han podido ser objeto de búsqueda ya que requieren referencias a las secuencias especificadas. Dado que el solicitante no ha sometido una lista de las secuencias sobre papel y legible por máquina como lo requiere la Regla 5.2 del PCT, esta Administración no puede efectuar una búsqueda provechosa de la secuencia per se. Sin embargo, las reivindicaciones han sido objeto de una búsqueda en todo cuanto ha sido posible con referencia al resto de la descripción.